

**VERIFICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE DETERMINACIÓN DE
DIÓXIDO DE AZUFRE EN FUENTES FIJAS DE COMBUSTIÓN POR
FLUORESCENCIA PULSADA”**

*VERIFICATION OF ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF SULFUR
DIOXIDE EMISSIONS FROM STATIONARY SOURCES BY PULSED
FLUORESCENCE*

Pérez Lander¹, Gallegos Lilian², Acosta Gabriel³

¹*Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de
Ambato. Avenida Los Chasquis y río Payamino. C.P. 18-01-0334. Ambato –
Ecuador*

²*Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Técnica de Ambato. Avenida Colombia
y Chile. C.P. 18-01-0334. Ambato – Ecuador*

³*Ambi For Health “AFH”, Diego Velasquez, OE4-95, Quito – Ecuador.*

Autor para correspondencia: lv.perez@uta.edu.ec

RESUMEN

La verificación, tiene generalmente como objetivo, el comprobar que el laboratorio domina el método de ensayo normalizado y lo utiliza correctamente para el caso de tratarse de un método normalizado modificado, así mismo; para la verificación se requiere solo realizar aquellas pruebas que indiquen que la variación realizada no afecta el ensayo, y mediante la obtención de pruebas documentadas y demostrativas demostrar que el método de análisis es lo suficiente fiable y reproducible para conducirnos a obtener el resultado previsto dentro de un intervalos de trabajo definido. Es necesario señalar que los métodos descritos en normas o textos oficiales se consideran validados, aunque debe aclararse que ellos se refieren solamente a métodos generales. Para realizar la validación del método para la determinación de SO₂, se aplicó el método descrito en la USEPA Método 6C, y se comprobó la fiabilidad de esta normativa mediante la evaluación de la precisión, exactitud, linealidad y especificidad. Se incluyen además, la determinación de incertidumbre de la medición y el rango de trabajo para este

parámetro. Los rangos de trabajo: rango bajo (LR) el cual tiene límites de trabajo desde 1 ppm hasta 150 ppm de SO₂, con una incertidumbre de 6.27% y coeficientes de repetibilidad CV_r=0.68 y reproducibilidad CV_R=2.59 menores al 5%. El rango medio (MR) desde 150 ppm hasta 300 ppm de SO₂ con una incertidumbre de 2.90% y coeficientes de variación por repetibilidad CV_r=0.34 y reproducibilidad CV_R=0.56 menor al 1%. El rango alto (HR) cuyo nivel de trabajo es desde 304.6 ppm hasta 1029 ppm de SO₂ con una incertidumbre expandida de 2.59% y coeficientes de variación por repetibilidad y reproducibilidad también menores al 1%. CV_r= 0.075% y CV_R= 0.37%.

Palabras clave: verificación, fuentes fijas de combustión, fluorescencia ultravioleta, dióxido de azufre..

ABSTRACT

It is important to accomplish the verification of the methods that are performed in test or calibration laboratories to recognize the limitations and applicability of the protocols used, whether they are standardized or not. In order to adapt procedures to the environment and activities performed in analysis routine. The analytical method for determination of sulfur dioxide emissions from stationary sources using instrumental analyzer procedure by pulsed fluorescence (SO₂) was validated in its three work ranges, low rank (LR) which has work limits from 1 ppm to 150 ppm SO₂, with an uncertainty of 6.27% and repeatability and reproducibility coefficients lower than 5%. Medium rank (MR) starting from 150 ppm to 300 ppm SO₂ with an uncertainty of 2.90% and repeatability and reproducibility coefficients lower than 1%. Finally, High rank which work level is from 304.6 ppm to 1029 ppm SO₂ with an expanded uncertainty of 2.59% and variation repeatability and reproducibility coefficients lower than 1%. CV_r= 0.075% and CV_R= 0.37%.

Key words: verification, stationary sources, pulse fluorescence, sulfur dioxide.

1. INTRODUCCIÓN

Cuando se trabaja con procedimientos analíticos más o menos complejos, en los que participan instrumentos, se deben controlar un buen número de parámetros que sean

validables (Clark, MacDonald, Whitfield, & Wong, 2010). No se puede aplicar estrictamente el concepto de calibración, por lo tanto todos los métodos necesitan ser conocidos por los laboratorios que los utilizan, para establecer sus límites de aplicación y los parámetros que se van a utilizar para su control (Alves, 2012). Los laboratorio deben realizar proceso de validación cuando el método es nuevo, la misma se discute cuando se utiliza métodos oficiales los cuales están supuestamente validados (Dosal, 2008; Eurachem, 1998). El laboratorio deberá asegurarse de que es capaz de demostrar que cumple dichos parámetros si los quiere utilizar como propios, para lo que deberá llevar a cabo un diseño experimental adecuado que valide al laboratorio. Además se debe tener claro que la validación es una actividad continua que se alimenta, fundamentalmente, de los datos que se obtienen de las actividades que se realizan en el campo de la calibración y del control de calidad. La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados son confiables (Clark et al., 2010; Oiml, 2007). Puede llegar el caso de que como resultado de esta actividad continua, sea necesario cambiar los límites de aplicación del método.

La empresa de servicios ambientales Ambi For Health “AFH Services Cia. Ltda”, mantiene un creciente compromiso con la sociedad y la industria al ofrecer servicios de control de calidad ambiental, en parámetros de emisiones gaseosas calidad del aire y estudios de ruido complementado con asistencia técnica ambiental. Con este propósito se requieren métodos fiables que cumplan con las normativas nacionales e internacionales en todas las áreas de análisis (Eurachem, 2011). La validación de métodos es un componente esencial de las medidas que un laboratorio debe implementar para producir datos analíticos fiables. La realización de estas actividades de validación de los métodos de ensayo utilizados por el propio laboratorio, contemplan la satisfacción de las necesidades del cliente y la adecuación para realizar los ensayos previstos (Castelluci, 2005). Para manejar un sistema de aseguramiento de la calidad de un laboratorio ambiental, se debe tener en cuenta muchos componentes como la elaboración de los protocolos analíticos e implementación de las metodologías para medición de los parámetros, la validación de las metodologías analíticas aplicadas a la evaluación de la calidad ambiental de acuerdo con las recomendaciones de las agencias nacionales e internacionales, y la vigencia de muestras ambientales, incluyendo también

la elaboración de toda la documentación relacionada al proceso (Hoyos, 2010; Macas, 2011; Massart et al., 1997; Ole, 2005).

Los óxidos de azufre se producen por la oxidación del azufre contenido en los combustibles fósiles. La mayor parte de este azufre se convierte en dióxido de azufre (SO_2), el cual es incoloro, no flamable, altamente corrosivo y altamente irritante del sistema respiratorio (Apha., Awwa., & Wpcf., 1992; Sigler & Bauder, 2005). Además es el precursor de la formación de la lluvia ácida. Se disuelve con facilidad en el agua para formar ácido sulfuroso (H_2SO_3), el cual se oxida lentamente y forma ácido sulfúrico (H_2SO_4) con el oxígeno del aire. El SO_2 también puede formar trióxido de azufre (SO_3), vapor muy reactivo que se combina rápidamente con vapor de agua para formar un aerosol ultra fino de ácido sulfúrico, el cual es altamente perjudicial para la salud humana. (Riu & Boque 2003; USEPA, 1998)

2. METODOLOGÍA

Para la realización de las curvas de calibración del método 6C de las normas EPA, para la determinación de SO₂ en fuentes fijas de combustión, se trabajó con 3 rangos de concentración de acuerdo al ordenamiento planteado en la Tabla 1, con lo cual se procedió a realizar los cálculos de estimación lineal de la curva de calibración.

Rango	SO ₂ (ppm)	M.R.C.	Dilución	Valor a Obtener (ppm)
Alto	1029	21	1 en 10	102.9
Medio	151.9	25	0	205.8
Bajo	20.51	24	1 en 10	2.05

Tabla 1 Rangos de Concentraciones para validación del método

Se estableció tres niveles de concentración en cada rango de validación, en el caso de la determinación de SO₂, (rango bajo, rango medio, rango alto). En cada nivel poblacional o de concentración se aplicaron cinco réplicas cada 48 horas durante 5 días establecido de acuerdo al diseño experimental escogido para la validación el cual es un diseño completamente al azar (DCA) con el siguiente ordenamiento:

2.1 Verificación del método para la determinación de dióxido de azufre según Método 6C de la EPA.

El laboratorio decidió cuáles de los parámetros de desempeño del método necesitaban ser caracterizados con el fin de validar el método. La caracterización del desempeño de este método es un proceso costoso pero puede restringirse inevitablemente por consideraciones de tiempo y costo. Al empezar con una especificación analítica considerada cuidadosamente, se tubo una buena base sobre la cual planear el proceso de validación. Inicialmente el Organismo Evaluador de la Calidad determinó las principales restricciones tomando en cuenta las necesidades del cliente, la experiencia existente sobre el método y la necesidad de compatibilidad con otros métodos similares que ya estén en uso dentro del laboratorio o en otros laboratorios. Los principales parámetros pudieron ser determinados durante la etapa de puesta a punto del método:

2.1.1 Linealidad del sistema. Para el estudio de la linealidad del sistema se preparó una curva de calibración en un intervalo de concentración desde 2,0 hasta 152,0 ppm, que incluyó 3 concentraciones diferentes. El análisis se realizó por quintuplicado.

2.1.2 Precisión del método. En el caso de la repetibilidad, este estudio se realizó por quintuplicado a una muestra de concentración única que representó el 100,0 % de la cantidad teórica declarada; mientras que para la reproducibilidad, se analizó con la misma muestra homogénea de concentración única, y se efectuaron las valoraciones por 2 analistas en 5 ddías diferentes. Para su evaluación se realizó un análisis de varianza.

2.1.3 Exactitud, linealidad del método e intervalo. Para el estudio de la exactitud se empleó el método de recuperación, mediante la utilización de material de referencia certificado de concentración exactamente conocida. Simultáneamente, se analizaron la linealidad del método y el intervalo.

2.1.4 Incertidumbre de la medida.

La incertidumbre de una medición es el parámetro asociado al resultado, es decir, caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente pueden ser atribuidos al mesurando.

En este sentido, es importante que para la verificación de nuestro, se realice la determinación de las diferentes fuentes o componentes de la incertidumbre de la medición presentes:

Los cálculos de incertidumbre se desarrollaron aplicando las siguientes fórmulas para la estimación de la incertidumbre por preparación de soluciones de acuerdo a Eurachem (1998)

$$\mu_{MR} = C_{MR} \times \sqrt{\left(\frac{\mu_{MRC}}{\% \text{Pureza}_{MRC}} \right)^2 + \left(\frac{\mu_{Balón}}{\text{Vol.Aforo}} \right)^2 + \left(\frac{\mu_{Balanza}}{\text{Pesado}} \right)^2} \quad (\text{Ec.1})$$

Dónde:

C_{MR} = Concentración del Estándar Preparado.

μ_{MRC} = Incertidumbre del Material de Referencia Certificado.

$\% \text{Pureza}_{MRC}$ = Porcentaje de Pureza del Material de Referencia Certificado.

μ = Incertidumbre.

Vol.Aforo = Volumen final de aforo.

$\mu_{Balanza}$ = Incertidumbre de la Balanza.

Pesado = Peso utilizado para la preparación de la solución estándar.

2.2 Incertidumbre por resolución del equipo:

$$\mu_{Res} = \frac{\text{Resolución_del_Equipo}}{\sqrt{3}} \quad (\text{Ec.2})$$

Dónde:

La resolución la especifica el fabricante del equipo en el manual del usuario.

2.3 Incertidumbre del error tipo:

$$\mu_{ErrorTipo} = \frac{ErrorTipo(S_{xy})}{\sqrt{N}} \quad (Ec. 3)$$

N = Número de datos utilizados en la estimación lineal.

2.4 Incertidumbre por función de respuesta:

La incertidumbre por Linealidad viene dada por la siguiente expresión:

$$\mu_{FR} = \sqrt{\mu_{MR}^2 + \mu_{Res}^2 + \mu_{ErrorTipo}^2} \quad (Ec. 4)$$

Dónde:

μ_{MR} = Incertidumbre por preparación de estándares.

μ_{Res} = Incertidumbre por resolución del Equipo.

$\mu_{ErrorTipo}$ = Incertidumbre por Error Tipo (S_{XY}).

2.5 Incertidumbre por repetibilidad:

$$\mu_{rMR} = \frac{S_r}{\sqrt{n}} \quad (Ec. 5)$$

Dónde:

S_r = Desviación estándar por repetibilidad.

n = Número de observaciones totales por concentración utilizados en el cálculo de ANOVA.

2.5.1 Cálculo de incertidumbre por calibración del método

La incertidumbre de calibración se obtiene de la siguiente expresión:

$$\mu_{cal_Met} = \sqrt{\mu_{FR}^2 + \mu_{rMR}^2} \quad (Ec.6)$$

Dónde:

u_{FR} = Incertidumbre de la función de respuesta

u_{rMR} = Incertidumbre de tipo A o de repetibilidad

2.6 Incertidumbre por reproducibilidad:

$$\mu_{RMR} = S_R$$

S_R = Desviación estándar por Reproducibilidad.

2.7 Incertidumbre estándar del método

$$\mu_m = \sqrt{\mu_{FR}^2 + \mu_{RMR}^2} \quad (Ec. 7)$$

Dónde:

μ_{FR} = Incertidumbre por Linealidad.

μ_{RMR} = Incertidumbre por Reproducibilidad.

2.8 Incertidumbre expandida del método

$$U_m = \mu_m \times K \quad (Ec.8)$$

μ_m = Incertidumbre Estándar del Método.

$K = 2$

3. RESULTADOS

Para realizar el análisis de los resultados se procedió a ejecutar los protocolos establecidos para la obtención de datos experimentales de cada uno de los parámetros a validar y se establecen hipótesis basadas en la metodología del análisis de los analitos de interés las cuales se ponen a comprobación con los respectivos cálculos estadísticos.

3.1 Validación del método para la Determinación de Dióxido de Azufre en fuentes fijas

3.1.1 Linealidad del sistema. La curva de calibración a 280 nm resultó ser lineal en el intervalo de concentraciones comprendidos entre 24,0 y 192,0 µg/mL. Al aplicar el método de los mínimos cuadrados a los resultados registrados se obtuvo la ecuación de la recta que se expresó según $y = 11\ 019,41 x - 2\ 909,67$. El coeficiente de correlación lineal fue de 0,9998. Al aplicar la prueba de linealidad se obtuvo un valor de desviación estándar relativa del 0,22 % y al aplicar la prueba de proporcionalidad los límites de confianza del término independiente incluyen el cero.

3.1.2 Precisión del método. En la tabla 2 se exponen los resultados del experimento. Para el caso específico de la repetibilidad, los coeficientes de variación fueron menores que 1,5 % y el coeficiente de variación total menor que 2 %. Las F experimentales de Fisher resultaron ser menores que las tabuladas.

Tabla 2 Datos experimentales para el análisis de varianza a cada concentración.

REPETICIONES	CONCENTRACIÓN 1 (mg/l)		
	Días		
	D1	D2	D3
R1	RE 1-1	RE 2-1	RE 3-1
R2	RE 1-2	RE 2-2	RE 3-2
R3	RE 1-3	RE 2-3	RE 3-3
R4	RE 1-4	RE 2-4	RE 3-4
R5	RE 1-5	RE 2-5	RE 3-5

Elaborado por: Gabriel Acosta, 2015

3.1.3 Exactitud, linealidad del método e intervalo

Los resultados obtenidos en el estudio de la linealidad del método se muestran en la Tabla 3, donde la pendiente de la curva de recuperación presentó un valor de 0,9972.

La curva de recuperación mostró un comportamiento lineal dado por la ecuación de la línea recta y el coeficiente de correlación de 0,9993. La recuperación media fue del 98,7 %. Al aplicar la prueba de linealidad se obtuvo un valor de desviación estándar relativa igual al 1,0 % y el intervalo de confianza del término independiente incluyó el cero.

Se realizaron 3 curvas en días distintos con el fin de abarcar los posibles errores aleatorios o sistemáticos que pueda haber en el proceso. El coeficiente de determinación r^2 es de 0,9942 con el cual podemos tener una certeza de que los datos mantienen una tendencia uniforme, los límites superiores e inferiores de la recta de calibrado determinan la zona de confianza de medición los resultados que están dentro de la zona incluyen incertidumbre, precisión y exactitud, los límites de confianza se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 3 Límites superior e inferior, (LR).

Concentración (mg/L)	Límite Superior	Límite Inferior
5	0,0067	-0,0011
40	0,0213	0,0136
80	0,0381	0,0303
120	0,0548	0,0471
150	0,0674	0,0597

Elaborado por: Gabriel Acosta, 2015

El análisis de varianza demuestra que no existen diferencias significativas en ninguna de las concentraciones. Se determinó los coeficientes de variación de repetibilidad (%CV_r) y reproducibilidad (%CV_R) tomando el máximo de entre todas las concentraciones, de esta forma tenemos 13,70% CV_r y 12,58% CV_R. Con los datos del porcentaje de coeficiente de variación por reproducibilidad se obtuvo la expresión de Horwitz el cual sirve como un parámetro importante para obtener la incertidumbre de medida, dicha expresión se encuentra en la Figura 1.

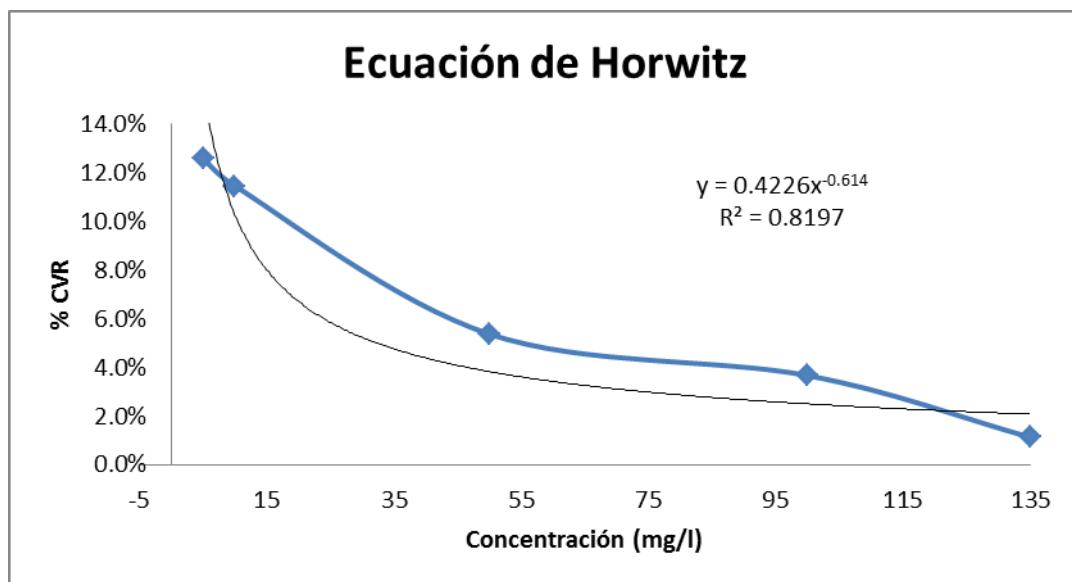


Figura 1. Curva de Horwitz, rango bajo (LR).

Se obtuvo una incertidumbre estándar expandida (U_m) máxima de 29,23% a la concentración de 5 mg/L O₂, y la mínima incertidumbre de 2,31% correspondiente a 135 mg/L. Se tomó el valor más grande de incertidumbre el cual se reportó en la declaración del método validado.

CONCLUSIONES

Se elaboraron matrices de validación para cada parámetro con el fin de demostrar los alcances y limitaciones que tiene cada método de análisis abarcando el rango de necesidades que tiene el “AFH”. Los límites de detección y cuantificación para el método de dióxido de azufre en fuentes fijas de combustión son 4 mg/L y 9 mg/L; 5 y 10 mg/L; 163 y 339 mg/L respectivamente, porcentaje de variación por repetibilidad igual a 13,7% en Lr; 4,21% en MR; 2,76% en HR, el porcentaje de variación por reproducibilidad $CV_R = 12,58\%$; 4,53%; 2,99% respectivamente y la incertidumbre estándar expandida igual al 29,23% en rango bajo; 9,09% en rango medio y 5,76% en rango alto. Por lo tanto el rango total validado en cada caso es de 5 a 150 mg/L en LR; de 100 a 1500 mg/L en MR y de 1000 a 15000 mg/L en HR.

RECONOCIMIENTO

Este trabajo se realizó gracias a la colaboración de la Universidad Técnica de Ambato y la empresa Amb For Health (AFH).

REFERENCIAS

- Alves, D. (2012). *Cálculo de incertidumbre de medición* (Vol. 1). Bogotá: Ed. Valbuena.
- Apha., Awwa., & Wpcf. (1992). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Madrid: Diaz de Santos.
- Castelluci, F. (2005). *Recomendaciones armonizadas para la validación de métodos de análisis en un solo laboratorio*. . París: Organización internacional de la viña y el vino.
- Clark, M. J. R., MacDonald, D. D., Whitfield, P. H., & Wong, M. P. (2010). Designing monitoring programs for water quality based on experience in Canada II. Characterization of problems and data-quality objectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(5), 385-398. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2010.02.005>
- Dosal, M. (2008). Introducción a la metroología química: Curvas de Calibración en los métodos analíticos. 1.
- Eurachem. (1998). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A laboratory guide to method validation and related topics*. Teddington.
- Terminology in Analytical Measurement - Introduction to VIM 3 (2011).
- Hoyos, M. (2010). *Estimación de la incertidumbre*. (Ingeniero Químico), Universidad Nacional de Colombia.
- Macas, J. (2011). *Validación de métodos analíticos para la determinación de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos en muestras de agua, en el centro de investigaciones y control ambiental "CICAM"*. Ambato: Universidad Técnica de Ambato. (Ingeniero Bioquímico), Universidad Técnica de Ambato, Ambato.
- Massart, D., Vandeginste, B., Buydens, L., Jong, S., Lewi, P., & Smeyers-Verbeke, J. (1997). *Handbook of chemometrics and qualimetrics*. Elsevier Science.

- Oiml. (2007). *Guidelines for the determination of recalibration intervals of measuring equipment used in testing laboratories*. Montana-USA: Well educated.
- Ole, B. (2005). *Procedimiento NMKL*. La Habana-Cuba: Comité Nórdico de Análisis, estimación y expresión de la incertidumbre de la medición en el análisis químico.
- Riu , J., & Boque , R. (2003). *Calibración Lineal* (Vol. 1). Tarragona Universitat Rovira i Virgili.
- Sigler, A., & Bauder, J. (2005). *Alcalinidad, pH y sólidos disueltos totales*. Montana USA: Well educated.
- USEPA. (1998). Method 6c. Determination of sulfur dioxide emissions from stationary sources (Instrumental Analyzer Procedure).